Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Eine automatische Bestimmung proteolytischer Enzymaktivitäten und ihre Anwendung bei Säulenchromatographischen Proteasenfraktionierungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
KLAUS WEIDLER

— 1969 —

Dekan: Prof. Dr. H. Witter
Referent: Priv. Doz. Dr. W. Leppla
Korreferent: Prof. Dr. F. Doenecke

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Eine automatische Bestimmung proteolytischer Enzymaktivitäten und ihre Anwendung bei Säulenchromatographischen Proteasenfraktionierungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
KLAUS WEIDLER

— 1969 —

Dekan: Prof. Dr. H. Witter
Referent: Priv. Doz. Dr. W. Leppla
Korreferent: Prof. Dr. F. Doenecke

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 3. Juli 1969 abgelegt.

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

A) Einleitung

I. Überblick zur Geschichte des Uropepsinogen S. 1
II. Die renale Ausscheidung des Plasmapepsinogen S. 2
III. Physiologische und pathologische Variation der Uropepsinogenausscheidung S. 2
IV. Heterogenität von Pepsin und Pepsinogen S. 3
V. Ionenaustauschchromatographie von Proteinen S. 6.
VI. Methoden zur Bestimmung saurer proteolytischer Enzymaktivitäten S. 18

B) Problemstellung S. 28

C) Eigene Untersuchungen

I. Die automatische Bestimmung saurer proteolytischer Enzymaktivitäten S. 29
II. Beispiele für die Anwendung der Methode S. 46

D) Diskussion S. 56

E) Zusammenfassung S. 60

F) Literaturverzeichnis S. 61

Überblick zur Geschichte des Uropepsinogens

Von BRÜCKE (4) beschrieb 1861 zum ersten Mal eine saure proteolytische Enzymaktivität im Urin von Hunden. Er nahm an, daß es sich um ein Enzym handelt, das im Magen-Darmtrakt reabsorbiert und renal ausgeschieden wird. Dieses saure proteolytische Enzym im Harn wurde von BENDERSKY (2) 1890 als "Uropepsin" bezeichnet. In der deutschen Literatur wird jetzt, anders als im angelsächsischen Schrifttum, häufiger die Bezeichnung "Uropepsinogen" verwendet. Diese Bezeichnung berücksichtigt, daß nicht "Pepsin", sondern die inaktive Vorstufe des Enzyms "Pepsinogen" ausgeschieden wird.
Untersuchungen von MATHES (22), FROUIN (9), FULD (11), HIRAYAMA (10) und van CALCAR (6) führten zu dem Schluß, daß die Magenschleimhaut die Quelle des "Uropepsinogens" darstellt. JANOWITZ und HOLLANDER (16) nehmen an, daß unter physiologischen Bedingungen etwa 99 % des in der Magenschleimhaut gebildeten Pepsinogens in das Magenlumen und 1 % in das Blut gelangen. Die Enzymbildung in der Magenschleimhaut verteilt sich demnach in zwei Richtungen (exokrin-endokrine Partition der Enzymsekretion).
Nach HIRSCHOWITZ (14) gehen kontinuierlich Hauptzellen der Magenschleimhaut zugrunde. Dabei tritt freiwerdendes Pepsinogen in den Interzellularraum aus und gelangt von

dort in das Blut.
MÜLLER (23) weist darauf hin, daß sowohl der Untergang von Hauptzellen als auch die Sekretionsleistung der Magenschleimhaut für den Übertritt von Pepsinogen in das Plasma bestimmend sein könnten.

Die renale Ausscheidung des Plasmapepsinogens

Wahrscheinlich gelangt das Plasmapepsinogen durch glomeruläre Filtration in den Harn. Nach PAPPENHEIMER (24) können Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu 40 000 die Glomerula passieren. In diesen Bereich fällt das Molekulargewicht des Uropepsinogens (20, 33). HIRSCHOWITZ (15) gibt unter Annahme einer Identität von Plasma-Pepsinogen und Uropepsinogen für die renale Uropepsinogen-Clearance-Werte zwischen 17 und 31 ml/min. an. Bei gesunden Kindern im Alter von 4 Monaten bis 13 Jahren ermittelte HERNANDEZ (13) Pepsinogen-Clearance-Werte zwischen 1,5 und 12 ml/min. Bei Annahme einer ausschließlichen glomerulären Filtration des Pepsinogens errechnet sich ein virtueller Siebungsfaktor für Pepsinogen in der Größenordnung von 10^{-2} (20).

Physiologische und pathologische Variation der Uropepsinogenausscheidung

Die Bestimmung des Uropepsinogengehaltes erfolgte in der Mehrzahl der Untersuchungen im 24 h-Sammelurin. Die

Werte werden je nach der angewandten Bestimmungsmethode in verschiedenen relativen Maßeinheiten angegeben. Eine Zusammenstellung der wichtigsten einschlägigen Untersuchungen über die normale und die pathologische Variation der Uropepsinogenausscheidung findet sich bei AGNE (1), BROKATE (3) sowie KELLER u.Mitarb. (17a). Aus diesen Übersichten ergibt sich, daß eine vermehrte Uropepsinogenausscheidung bei Ulcus duodeni und eine verminderte oder aufgehobene Uropepsinogenausscheidung bei perniciöser Anämie und atrophischer Gastritis als gesichert gelten können.

Die Heterogenität von Pepsin und Pepsinogen

Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß das saure proteolytische Proenzym der Magenschleimhaut "Pepsinogen" wie auch das saure proteolytische Proenzym des Harns "Uropepsinogen" beide nicht einheitlich sind (TANG u.Mitarb. (34, 35); TAYLOR u.Mitarb. (36, 37), SEIJFFERS u.Mitarb. (27 - 32); FREIS und LEPPLA (7), KUSHNER u.Mitarb. (18); KELLER u.Mitarb. (17, 17a, 20)). In menschlichen Magenschleimhautextrakten wurden elutionschromatographisch und immunochemisch bis zu vier saure proteolytische Proenzyme nachgewiesen (TANG u.Mitarb. (34, 35), SEIJFFERS u.Mitarb. (27, 28, 30, 32); KUSHNER u.Mitarb. (18)). Die bisher vorliegenden elutionschromatographischen Untersuchungen des sauren proteolytischen

Proenzyms im Harn lassen die Uneinheitlichkeit auch des "Uropepsinogen" erkennen (SEIJFFERS u.Mitarb. (29); KELLER u.Mitarb. (17)). Diese Befunde müssen als neue Ausgangspunkte für die Methodik sowie für die physiologische und klinische Interpretation von Untersuchungen der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harns zugrunde gelegt werden.

Um einen Vergleich der sauren proteolytischen Aktivität des Magens, des Plasmas und des Harns zu ermöglichen, müßten die Enzyme unter vergleichbaren Bedingungen fraktioniert werden.

Die Identität der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Magens, des Plasmas und des Harns wäre gesichert, wenn sich Parallelen bezüglich ihrer Heterogenität finden ließen. (z.B. gleiche Zahl proteolytisch aktiver Komponenten mit gleichen Eigenschaften bezüglich ihrer Substratspezifität, ihres chromatographischen Verhaltens usw.). Bewiesen wäre die Identität aber erst durch den Nachweis gleicher Aminosäuresequenzen der verschiedenen Magen-, Harn- und Plasmapepsinogene. Dann wäre auch die Voraussetzung zur Bestimmung der renalen Clearance der Plasmapepsinogene gegeben.

Im folgenden soll zunächst eine Übersicht über die Grundlagen der Ionenaustauschchromatographie von Proteinen und ihre bisherige Anwendung auf die Fraktionierung des Pepsinogens gegeben werden. Ferner sollen die bisher

zur Bestimmung der sauren proteolytischen Enzymaktivität ("Pepsin") verwendeten Methoden kurz dargestellt werden. Dabei sollen die neueren, zur Analyse von chromatographischen Fraktionierungen besonders geeigneten automatischen Modifikationen der Bestimmung saurer proteolytischer Enzymaktivität eingehender beschrieben werden.

Für die folgende Übersicht erscheint eine eingehende Betrachtung der bisherigen Pepsin und Pepsinogen-Fraktionierungen erforderlich, da für jedes Protein aus einer großen Zahl experimenteller Bedingungen eine optimale ausgewählt werden soll. Außerdem müssen die zu wählende Trennungsmethode und Uropepsinogenbestimmungsmethode in verschiedener Hinsicht aufeinander abgestimmt werden.

Die Ionenaustauschchromatographie von Proteinen

Die Ionenaustauschchromatographie ermöglicht die weitgehende Trennung einzelner Proteine aus einem Proteingemisch.

Die funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers bilden mit den ionisierten Gruppen der Aminosäuren der Proteine ein System multipler elektrostatischer Bindungen aus. Die Zahl derartiger Bindungen zwischen Ionenaustauscher und Protein ist unter anderem von der Ladungsdichte und der Ladungsverteilung auf der Oberfläche des Proteins abhängig (39) und somit von Protein zu Protein verschieden. Auf diese Weise werden eine oder mehrere Proteinkomponenten aus dem Proteingemisch am Ionenaustauscher fixiert. Es wird deshalb verständlich, daß z.B. Enzyme gleicher Substratspezifität aber verschiedener Ladungsdichte und Ladungsverteilung unterschiedlich feste Bindungen am Ionenaustauscher aufweisen und deswegen bei der Elution als unterscheidbare Proteine getrennt werden. Diese elektrostatische Bindung wird mehr oder weniger durch adsorptive Bindungen überlagert. Im Grenzfalle kommt es zu einer irreversiblen adsorptiven Bindung (Adsorption von Proteinen an schwach sauren Kationenaustauscher auf Harzbasis bei pH 5,0 (39)).

Der Elutionsmechanismus läßt sich vereinfacht an den beiden idealisierten Grenzfällen reiner elektrosta-

tischer und reiner adsorptiver Bindung erklären.
Bei multipler elektrostatischer Bindung wird oberhalb oder unterhalb einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration oder oberhalb einer gewissen Ionenstärke des Elutionsmittels auch noch die letzte Bindung zwischen Protein und Ionenaustauscher gelöst werden. Die Proteinkomponenten wandern dann mit der gleichen Geschwindigkeit wie das Elutionsmittel durch das Ionenaustauscherbett. Im Sinne der idealisierten Vorstellung bei der Chromatographie ist dann das Verhalten des Proteins im Ionenaustauscher durch den "Rf-Wert" 1 beschrieben oder, für den Fall der vollständigen Fixierung des Proteins am Ionenaustauscher, durch den "Rf-Wert" 0.
Bei reiner adsorptiver Bindung erfolgt die Trennung der Proteine über einen vielstufigen Adsorptions-Desorptions-Zyklus. Sie treten damit in mehr oder weniger breiten Banden im Eluat auf.
Das chromatographische Verhalten der meisten Proteine wird mehr oder weniger stark durch beide Mechanismen beeinflußt. Die experimentellen Bedingungen zur chromatographischen Trennung von Proteinen sind durch deren Eigenschaften als polyvalente, kompakte Makroionen gegeben. Mithin werden sie unter anderem durch die molekulare Größe, den Ladungszustand und Stabilität der sekundären und tertiären Strukturen bestimmt. Diese physikalisch- chemischen Parameter hängen im Lösungszustand von der iona-

len Zusammensetzung, der Ionenstärke und dem pH des Äquilibrierungs- und Elutionsmittel ab. Letztere sind so zu wählen, daß die strukturelle Stabilität der zu trennenden Proteine in Lösung und am Ionenaustauscher gewahrt bleibt. Werden Ionenaustauscher, Äquilibrierungsmittel oder Elutionsgradient nicht richtig gewählt, so kann es zu einer irreversiblen Strukturänderung des Proteins (Denaturierung) kommen.
Im folgenden seien die zu wählenden Untersuchungsbedingungen entsprechend dem Ablauf der chromatographischen Analyse diskutiert:

1. Das Lösungsmittel des Proteingemischs

pH-Wert und Ionenstärke des als Lösungsmittel benutzten Puffersystems müssen so gewählt werden, daß das zu untersuchende Protein aus dem Proteingemisch an den Ionenaustauscher vollständig fixiert wird. Dieser Vorgang sollte nach Möglichkeit auf Ionenaustausch beruhen.

2. Der Ionenaustauscher

Die Matrix des Ionenaustauschers soll bei vorgegebenen Adsorptions- und Elutionsbedingungen keine irreversiblen Konfigurationsänderungen des zu untersuchenden Proteins bewirken. Ionenaustauscher mit hydrophiler Matrix, z.B. solche auf Zellulose und Dextranbasis erfüllen diese Forderungen. Infolge ihres hohen Wasserbindungsvermögens

und ihrer Quellfähigkeit bieten sie zusätzlich den Vorteil einer großen Kapazität gegenüber Ionenaustauschern auf Kunstharzbasis. Die Ionenaustauscher auf Dextranb sis bilden ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Porengröße durch verschiedene Grade der Vernetzung variiert werden kann. In weitmaschige Netzwerke können Proteine durch Diffusion eindringen. Somit werden dann auch die nur durch Diffusion erreichbaren funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers noch besetzt. Seine funktionellen Gruppen sollen bei vorgegebenem pH-Wert dissoziiert sein und sich entsprechend dem Massenwirkungsgesetz im Gleichgewicht befinden mit den Ionen des Puffers, der zur Äquilibrierung verwendet wird. Es ist bekannt, daß die Porengröße der Ionenaustauscher von der Ionenstärke des Elutionsmittels abhängt. Mit steigender Ionenstärke wird eine "Verkleinerung" der Porengröße beobachtet. Daraus ergibt sich eine Volumenverminderung der einzelnen Partikel und das gesamte Ionenaustauscher-Material in einer Säule schrumpft. Dieser Effekt ist mitbestimmend für den hydrodynamischen Widerstand des Ionenaustauscher - Materials bei der Elution.

3. Die Form der zu verwendenden Säule

Wie in der folgenden Aufstellung von Chromatographiebedingungen ersichtlich ist, werden meist Säulen mit einem Durchmesser-Höhenverhältnis von 1 : 10 bis 1 : 20 verwendet.

4. Die Säulentemperatur

Bei der Wahl der Säulentemperatur ist zu berücksichtigen, daß Proteine denaturierbar sind und während des Ionenaustausches an der Säule reversible Konfigurationsänderungen erfahren können. Bei tieferen Temperaturen laufen diese Prozesse erfahrungsgemäß langsamer ab. Zu tiefe Temperaturen (0 - 4° C) begünstigen in der Regel eine verstärkte Adsorption am Ionenaustauscher und können sich somit nachteilig auswirken (39).

5. Das Elutionsverfahren

Unter den verschiedenen möglichen Elutionsverfahren erscheint das der kontinuierlichen Gradientenelution am günstigsten. Der Gradient wird entweder durch die stetig sich ändernde Ionenstärke oder durch den kontinuierlich sich ändernden pH-Wert des Elutionsmittels gebildet. Durch dieses Vorgehen wird schließlich die Ionenstärke oder der pH-Wert erreicht, der für die Ablösung des zu trennenden Proteins vom Ionenaustauscher erforderlich ist. Durch Anwendung kontinuierlicher Gradienten vermeidet man das Verbreitern der Banden und die Entstehung von Artefakten, wie sie öfters bei der stufenweisen Änderung der Ionenstärke oder des pH-Wertes auftreten (39). Zu Beginn der säulenchromatographischen Trennung eines Proteingemisches wird zweckmäßig der lineare Gradient verwendet.

Der lineare Gradient wird in einer Mischkammer erzeugt, welche über ein Hebersystem mit einem Reservoir von gleichem Querschnitt verbunden ist. Nach dem Heberprinzip müssen die Flüssigkeitsspiegel beider Gefäße gleichmäßig absinken.
In der Mischkammer befindet sich die zu Beginn erwünschte Konzentration der Elutionsflüssigkeit. Das Reservoir enthält die beabsichtigte Endkonzentration, welche durch Zufluß in das Mischgefäß erreicht wird.

6. Die Elutionsgeschwindigkeit

Die Flußgeschwindigkeit wird beeinflußt durch die Partikelgröße des verwendeten Ionenaustauschers, durch deren Veränderung in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Elutionsmittels und von der geometrischen Form der Säule. Möglicherweise kann die durch die Sorption an den Ionenaustauscher veränderte Struktur eines Proteins als zeitbestimmender Faktor in die Elution eingehen, da die Rückbildung der spezifischen Faltung in vielen Fällen eine langsame Reaktion ist.
Eine Druckerhöhung, die den steigenden hydrodynamischen Widerstand kompensiert, kann leicht dazu führen, daß deformierbare Ionenaustauscherpartikel ihre Form verändern. Je nach dem Grad der Deformierbarkeit wird die Elutionsgeschwindigkeit sich dann mit steigendem Druck nicht mehr linear ändern. Sie kann sogar mit steigendem Druck nach Durchlaufen eines Maximums wieder abnehmen

wie dies z.B. für den Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A 50 bekannt ist. In solchen Fällen ist bei steigendem hydrodynamischem Widerstand der angewandte Druck herabzusetzen.

Chromatographische Analysen verschiedener Autoren

Zusammenstellung nach THEISS (38)

Autoren	untersuchtes Enzym	Lösungsmittel des untersuchten Enzyms
RYLE and PORTER	Schweinepepsinogen und Schweinepepsin	0,1 M Acetatpuffer, pH 5,6 und 0,02 M Acetatpuffer, pH 6,9
RICHMOND	Pepsin des menschlichen Magensaftes	0,2 M Citratpuffer pH 3,02
TANG	Pepsin des menschlichen Magensaftes	0,2 M Citratpuffer, pH 3,0 und 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5
KUSHNER	Pepsinogen der menschlichen Magenschleimhaut	0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7
SEIJFFERS	Pepsinogen der menschlichen Magenschleimhaut und das proteolytische Enzym des menschlichen Urins	0,1 M Acetatpuffer, pH 5,3

Autoren	Ionenaustauscher	Volumen der Einzelfraktion u. Elutionsgeschwindigkeit
RYLE and PORTER	DEAE-Cellulose äquilibriert in 0,1 M Acetatpuffer pH 4 und DEAE-Cellulose äquilibriert in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,9	45 ml 45 - 50 ml/h
RICHMOND	Amberlite IRC - 50 x 64 äquilibriert in 0,2 M Citratpuffer pH 3,02	30 ml 30 ml/h
TANG	Amberlite IRC - 50 x 64 äquilibriert in 0,2 M Citratpuffer pH 3,0 und DEAE-Cellulose äquilibriert in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5	10 ml 1 - 1,2 ml pro Minute
KUSHNER	DEAE-Cellulose äquilibriert in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer	10 ml 10 ml/h
SEIJFFERS, MILLER, SEGAL	DEAE-Cellulosebath 1410 (Brown & Co) äquilibriert in 0,1 M Acetatpuffer pH 5,3	15 ml 30 - 45 ml/h

Autoren	Säulendimension		Säulentemperatur
RYLE and PORTER	Durchmesser Höhe	5 cm 35 cm	Versuch wurde in der Kälte durchgeführt
RICHMOND	Durchmesser Höhe	4,5 cm 20,0 cm	17° C - 20° C
TANG	Durchmesser Höhe Durchmesser Höhe	4,4 cm 15,0 cm 3,0 cm 30,0 cm	Raumtemperatur oder 2° C - 4° C
KUSHNER	Durchmesser Höhe	2,0 cm 20,0 cm	nicht angegeben
SEIJFFERS, MILLER, SEGAL	Durchmesser Höhe	2,0 cm 20,0 cm	8° C - 15° C

Autoren	Elutionssystem
RYLE and PORTER	Gradient mit kontinuierlich ansteigender NaCl-Konzentration. Dies wurde erreicht durch Einlaufen eines 0,1 M Acetatpuffer von pH 4,0 und 0,2 M NaCl
RICHMOND	Diskontinuierliches Gradientensystem von 0,2 M Citratpuffer von verschiedenen pH-Werten: 3,02, 3,50, 4,42, 5,33, 6,5, 7,2
TANG	Diskontinuierlicher Gradient von 0,2 M Citratpuffer von verschiedenen pH-Werten: 3,0, 3,8, 4,2, 4,6
KUSHNER	Die Gradientenelution wurde mit einem System erzeugt, das aus einem runden Mischgefäß und einem konischen Reservoir bestand. Das Mischgefäß enthielt zu Beginn der Fraktionierung 500 ml eines 0,01 M Phosphatpuffers von pH 7,0. Das konische Reservoir enthielt 250 ml eines 0,4 M Phosphatpuffers von pH 5,65. Dadurch wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Molarität des Elutionspuffers und ein Abfall des pH-Wertes erreicht. Nachdem beide Gefäße leer geworden waren, ließ man einen 0,4 M Phosphatpuffer von pH 5,65 durch die Säule laufen, bis die Adsorption bei 280 nm zu einer stets gleich bleibenden Höhe zurückkehrte. Dann ließ man eine 0,8 M NaCl in 0,4 M Phosphatpuffer von pH 5,4 durch die Säule laufen.

Autoren	Elutionssystem
SEIJFFERS	Die Elution erreichte man durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten, den man mit Hilfe eines Varigrades erzeugte. Dieser hatte 9 Zylinder die NaCl enthielten, das in 250 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,3 gelöst war; der NaCl-Gehalt betrug: Zur Elution der Pepsine 0,230 M/l, 0,230 M/l, 0,230 M/l, 0,230 M/l, 0,235 M/l, 0,240 M/l, 0,245 M/l, 0,255 M/l, 0,260 M/l

Methoden zur Bestimmung der sauren proteolytischen Aktivität

1. Die Ermittlung der sauren proteolytischen Enzymaktivität mit Hilfe diskontinuierlicher Methoden ist auf zwei Wegen möglich.
   a) Die Enzymaktivität wird in einem heterogenen System bestimmt (das Substrat bildet die feste Phase).
   b) Der Aktivitätstest wird im homogenen Medium vorgenommen (das Substrat liegt in einer echten makromolekularen Lösung vor).

2. Die kontinuierlichen Methoden
   Die kontinuierlichen Methoden bauen auf diskontinuierlichen Methoden auf, die im homogenen Medium durchgeführt werden. Man unterscheidet zwei Möglichkeiten
   a) halbautomatische Verfahren schließen die Proteolyse nicht mit ein. Nach beendeter Proteolyse wird in einem automatischen Meßsystem das Ausmaß der proteolytischen Aktivität bestimmt.
   b) Vollautomatische Verfahren schließen die Proteolyse mit ein.

   Zu 1 a:
   Ein Beispiel für die Bestimmung der Enzymaktivität in einem heterogenen System ist die Fibrin-Methode nach GRÜTZNER (12).
   Es wird der proteolytische Abbau des Substrates Fibrin

durch das zu bestimmende Enzym im sauren Milieu gemessen. Dies geschieht gravimetrisch oder über die aus karmingefärbtem Fibrin auswaschbare Farbstoffmenge. Diese Methode kann nur im sauren Milieu durchgeführt werden, da im alkalischen Milieu das karmingefärbte Fibrin entfärbt wird.

Zu 1 b:

Enzymkinetisch einfacher sind die Bestimmungen im homogenen System.

a) Bei der Edestin-Methode nach GOTTLIEB (11) wird das aus dem Hanfsamen gewonnene Globulin Edestin als Substrat mit dem zu bestimmenden proteolytischen Enzym inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 bis 120 Stunden ist über die Bestimmung des noch unverdauten Edestin die verbrauchte Edestinmenge ein Maß für die Enzymaktivität.

b) Die WEST-Methode (41) beruht auf der Messung des Gerinnungszeitpunktes eines Eiweißkörpers. Das in der Milch enthaltene Caseinogen wird durch die saure proteolytische Aktivität eines Enzyms zu Casein umgewandelt. Der Beginn der Gerinnung wird als Ende der Reaktion festgelegt. Eine WEST-Einheit entspricht z.B. dem 10fachen des Urinvolumens in ml, das in 100 sec. den Gerinnungsvorgang einzuleiten vermag.

c) BUCHS und FREUDENBERG verwendeten Gelatine und Caseinlösungen als Substrat (5).

Gewöhnliche Handelsgelatine wird 0,5 %ig in HCl-Glykokoll-Puffer aufgeschwemmt, nach Aufkochen entsteht eine wasserklare Lösung. Das zu bestimmende proteolytische Enzym wird in die Gelatinelösung inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Minuten wird 1 ml Substrat in 4 ml 0,5 %ige Gummiarabicum-Lösung pipettiert. Die nicht verdaute Gelatine wird mit 5 ml 20 %iger Trichloressigsäure ausgefällt. Die Trübung ist homogen und stabil und kann nephelometriert werden.
In ähnlicher Weise werden 2 %ige Caseinlösungen mit einem proteolytischen Enzym inkubiert. Das nicht verdaute Casein wird mit 20 %iger Trichloressigsäure ausgefällt und im Filtrat der Rest-N nach Kjeldahl bestimmt.

Die im Jahr 1932 von ANSON (1a) veröffentlichte Methode ist die gebräuchlichste diskontinuierliche Bestimmung der proteolytischen Enzymaktivität in Magensaft, Plasma und Urin. Es wird dabei Hämoglobin als Substrat benutzt. Der pH liegt zwischen 1,5 und 2,5, die Inkubationszeit zwischen 20 Minuten und 1 Stunde, bei einer Inkubationstemperatur von 37° C. Die Proteolyse wird durch Ausfällung des unverbrauchten Hämoglobins mit Trichloressigsäure gestoppt. Im Filtrat werden die Folin-Ciocalteu-positiven Substanzen als Maß für die proteolytische Aktivität erfaßt.
Von einigen Untersuchern wird auch die proteolytisch

bedingte Zunahme des Alpha-Amino Stickstoffs mit der Ninhydrin-Reaktion bestimmt.

Zu 2 a:

Halbautomatische Verfahren werden angegeben von LEPPLA u.Mitarb. (7, 8) und von SEIJFFERS u.Mitarb. (27).

Von den Autoren werden die Konzentrationen der trichloressigsäurelöslichen Spaltprodukte ermittelt und in Äquivalenten Tyrosin ausgedrückt. In der Reaktion werden entweder der Alpha-Amino-N oder die Parahydroxygruppen aromatischer Aminosäuren erfaßt.

Die Alpha-Amino-N-Bestimmung liefert ein Maß für das Zahlenmittel des Polymerisationsgrades der Spaltprodukte.

Bei der zweiten Methode wird der Gehalt an aromatischen Aminosäuren in den Spaltprodukten bestimmt.

In der folgenden Abbildung Nr. 1 ist das von LEPPLA u.Mitarb. angegebene Fließschema gezeigt.

Zu 2 b:

Ein vollautomatisches Verfahren wurde von BROKATE (3) entwickelt. Der besondere Vorteil dieses Verfahrens besteht in der Möglichkeit einer fortlaufenden pH-Kontrolle in einer definierten Versuchsanordnung mittels Mikroelektroden (Astrup-Gerät). So können pH-Umsatzkurven aufgestellt werden.

Grundlagen:

Die zu bestimmende saure proteolytische Aktivität

wirkt bei geeigneter Wasserstoffionenkonzentration auf Hämoglobin als Substrat ein. Ein Teil der entstehenden Spaltprodukte des Hämoglobin wird anschließend durch Dialyse abgetrennt. Im Dialysat werden die Spaltprodukte als Folin-Ciocalteu-positive Substanzen erfaßt. Es erfolgt dabei eine Reduktion des Phosphor-Molybdän-Wolframreagenz (Folin-Ciocalteu) bei Anwesenheit von Tyrosin und Tryptophan.

Das System stellt eine Kombination von Autoanalyzer-Elementen dar.

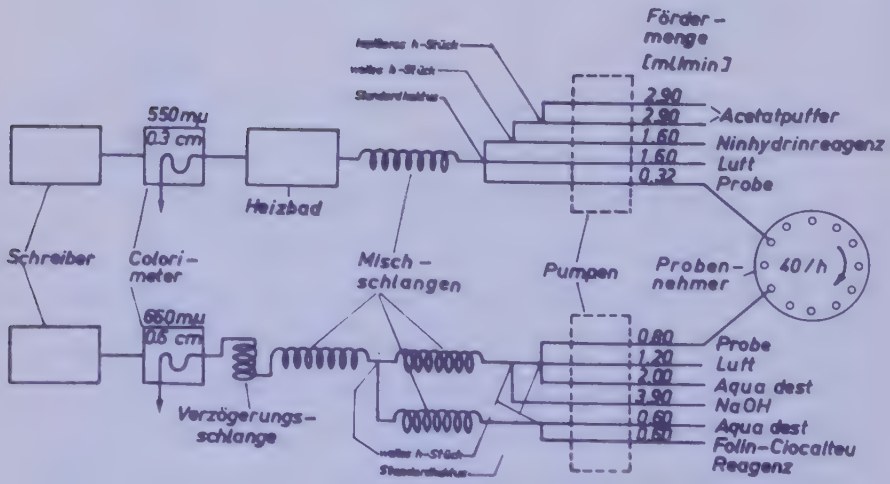

Abbildung 1: Automatische Bestimmung der Ninhydrin- bzw. Folin-Ciocalteu-positiven Substanzen im Trichloressigsäurefiltrat der Proteolyseansätze mit dem Autoanalyzer Technicon.

In der folgenden Abbildung Nr. 2 wird das Fließdiagramm der automatischen Proteasenbestimmung wiedergegeben. Die einzelnen Proben mit proteolytischem Enzym werden einem kontinuierlichen Hämoglobinstrom zugeführt (20 Proben pro Std.). Die kontinuierliche Zugabe einer HCl-Lösung von bestimmter Normalität erzeugt die für die Inkubation gewünschte Wasserstoffionenkonzentration. Zugegebene Luft segmentiert das auf diese Weise automatisch angesetzte Reaktionsgemisch. Die gewünschte Inkubationszeit wird durch Wahl der Länge und Anzahl geeigneter Verzögerungsschlangen festgelegt. Diese Verzögerungsschlangen befinden sich in einem regelbar thermostatisierbaren Wasserbad. Am Ende der Inkubationsstrecke wird ein Bruchteil des Reaktionsgemisches abgezweigt und zur pH-Messung verwendet. Die pH-Messung geschieht mit einem Radiometer AME-I Astrup equipment (Radiometer Copenhagen).

Ein Teil der Reaktionsprodukte der Proteolyse wird durch kontinuierliche Dialyse gegen einen segmentierten NaCl-Strom (0,9 %ig) vom Reaktionsgemisch getrennt. In einem angeschlossenen kontinuierlichen System wird die Konzentration der Reaktionsprodukte im Dialysat colorimetrisch erfaßt.

Die proteolytische Aktivität:

Die Differenz zwischen Probenvollwert und Probenleerwert ist ein direktes Maß für die proteolytische Aktivität.

I. Probenvollwert:

In den Probenvollwert gehen die dialysablen Folin-Ciocalteu-positiven proteolytischen Spaltprodukte des Hämoglobins ein. Er enthält außerdem die primär in den Proben vorhandenen Folin-Ciocalteu-Substanzen.

II. Probenleerwert:

Der Probenleerwert erfaßt die in den thermisch inaktivierten Proben enthaltenen Folin-Ciocalteu-positiven Substanzen. Er enthält dagegen keine durch proteolytische Spaltung des Hämoglobins entstandenen Folin-Ciocalteu-positiven Substanzen. Die Inaktivierung der Proben erfolgt durch Inkubation im siedenden Wasserbad für 15 Minuten. Inaktivierte Pepsinogenlösungen weisen einen Probenleerwert unter der Nachweisbarkeitsgrenze auf.

Die Reagentien:

1. HCl-Lösungen in Konzentrationen von 0,025 N bis 1,00 N
2. NaCl-Lösung: 0,9 %ig
3. 0,7 N NaOH-Lösung erzeugt im Folin-Ciocalteu-System einen optimalen pH-Wert von 7,5.
4. Hämoglobinlösung: 30 g Rinderhämoglobin (hemoglobin substrate, salt free, Nr. 2382 Mann Res.Lab., New York)

werden mit etwa 500 ml bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Nach 30 Minuten wird die Aufschwemmung auf einer Nutsche abgesaugt (Filter: Schleicher & Schüll Nr. 595). Anschließend wird die Lösung bis zum Verbrauch bei $+4^{\circ}$ C aufbewahrt. Sie ist 24 Stunden verwendbar.

5. Folin-Ciocalteu-Reagenz: Das Reagenz wurde aus Natriumwolframat, Natriummolybdat, Phosphorsäure, konzentrierter HCl, Brom, Lithiumsulfat und Wasser nach Vorschrift (Hoppe, Seyler, Thierfelder Physiol. und physiol. chem. Analysen, 10. Auflage III/i, S. 600) hergestellt und behandelt.

6. Eichlösungen: Pepsinogen:
Schweinepepsinogen (Nr. 725, Mann Res.Lab., New York) wurde verwendet in Konzentrationen von 0,5 bis 100 Mikrogramm/ml gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung.
Tyrosin:
L (-) Tyrosin (Nr. 8371, E. Merck AG, Darmstadt) wurde in Konzentrationen von 5 - 200 Mikrogramm/ml gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung verwendet.

Die Eichlösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt bei Nichtgebrauch und nicht länger als drei Tage verwendet.

Diskussion der Methode

Durch die Automatisierung mittels des Autoanalyzers hat dieser Test die größte Konstanz der Reaktionsbedingungen und damit die beste Reproduzierbarkeit. Es werden Enzymaktivitäten im Bereich von 2 bis 100 Mikrogramm Schweinepepsinogen/ml Probe erfaßt. Die dabei auftretenden Reaktionsproduktkonzentrationen (Folin-Ciocalteu-positive Substanzen) entsprechen Tyrosinkonzentrationen von 5 bis 200 Mikrogramm Tyrosin/ml Eichlösung. Die Reproduzierbarkeit entspricht $\pm$2 bis 5 Mikrogramm Tyrosin/ml im Meßbereich zwischen 5 bis 200 Mikrogramm Tyrosin/ml.

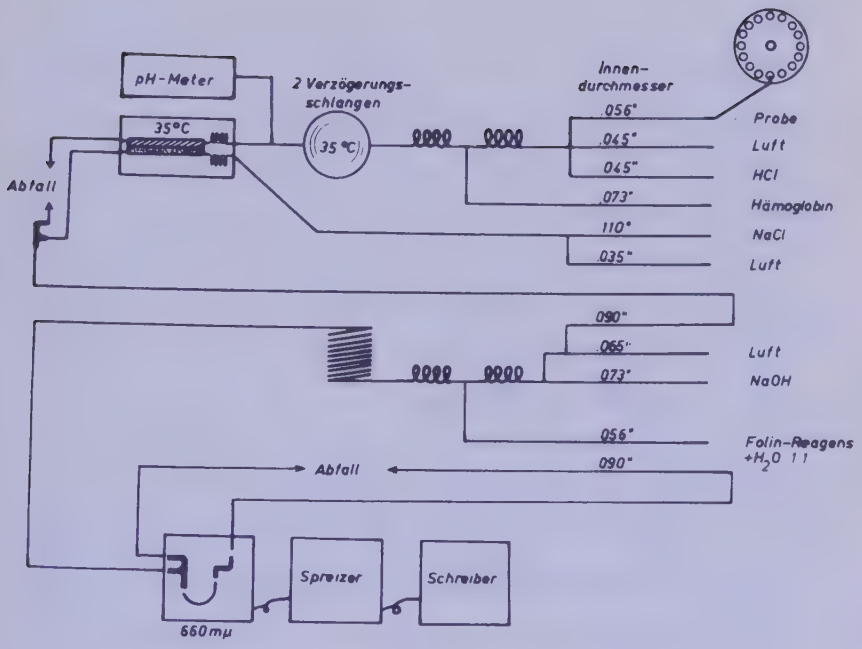

Abbildung 2: Fließdiagramm des von BROKATE angegebenen automatisierten Bestimmungsverfahrens für saure proteolytische Enzymaktivitäten.

Problemstellung

Der Überblick über die bisher vorliegenden Ergebnisse von säulenchromatographischen Fraktionierungen der sauren proteolytischen Enzymaktivität ("Pepsin") an Magensaft, Magenschleimhaut und Harn zeigt, daß diese Fraktionierungen nur dann optimal durchführbar sind, wenn ein geeignetes Testsystem zur Bestimmung der proteolytischen Enzymaktivität in den Eluaten verfügbar ist. Die Testbedingungen müssen sich für die rasche Analyse großer Serien eignen und der Test muß genügend empfindlich sein, um auch die niedrigsten im Eluat anfallenden Enzymaktivitäten ohne die Notwendigkeit einer vorherigen Konzentrierung zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, daß die von BROKATE (3) entwickelte vollautomatische Modifikation der Anson-Methode in ihrer Empfindlichkeit um den Faktor 10 gesteigert werden kann, wenn man sie mit der Folin-Lowry-Mothode kombiniert. Die Brauchbarkeit dieser neuen Methode zur Bestimmung der sauren proteolytischen Enzymaktivität im Eluat von Ionenaustauschersäulen soll am Beispiel der Fraktionierung von Pepsin oder Pepsinogen aus dem Magensaft und von Uropepsinogen demonstriert werden.

Die automatische Bestimmung proteolytischer Enzymaktivität und ihre Anwendung bei säulenchromatographischen Proteasenfraktionierungen

Die Messung proteolytischer Enzymaktivitäten mittels der beschriebenen diskontinuierlichen Verfahren erfordert einen verhältnismäßig großen Arbeitsaufwand. Serienanalysen, wie sie z.B. bei säulenchromatographischen Fraktionierungen proteolytischer Enzyme anfallen, können deswegen zu erheblichen Zeitverlusten führen. Mit solchen Zeitverlusten ist die Möglichkeit der Enzymdenaturierung gegeben. Diese und weitere Gründe erfordern eine automatische Bestimmung der proteolytischen Enzymaktivität. Eine vollautomatische Messung der proteolytischen Aktivität läßt sich in zwei prinzipiellen Versuchsanordnungen verwirklichen. Beide Versuchsanordnungen beziehen die enzymatische Reaktion in die kontinuierliche, automatische Analyse ein.

1. Es wird in üblicher Weise in einzelnen Ansätzen inkubiert. Aus den Ansätzen wird während der Inkubation die Konzentration eines oder mehrer Reaktionsprodukte, gegebenenfalls auch die Substratkonzentration kontinuierlich bestimmt.

2. Einzelne Proben mit proteolytischer Enzymaktivität werden nacheinander einem kontinuierlichen Substratstrom zugeführt. Nach Passage einer Inkubationsschlange wird

der Enzym-Substratstrom in ein zweites automatisches System gegeben. Dort wird die Konzentration eines oder mehrerer Reaktionsprodukte, gegebenenfalls auch die Substratkonzentration kontinuierlich bestimmt. Wenn es sich als nötig erweist, können vor Eintritt in das zweite System die Reaktionsprodukte durch kontinuierliche Dialyse oder durch andere Methoden vom Reaktionsgemisch getrennt werden.

Man kann erwarten, daß Bestimmungen der proteolytischen Enzymaktivität nach dem zuletzt dargestellten zweiten Prinzip umfangreiche Serienanalysen in kürzerer Zeit erlauben.

Eine proteolytische Enzymaktivität ist wie jede andere Enzymaktivität durch die Bruttogeschwindigkeit ($\pm$ dc/dt) der katalysierten Reaktion zu definieren. Das erste Prinzip gestattet eine automatische Bestimmung der Bruttogeschwindigkeit in zwei Ansätzen für jeweils eine Probe. Das zweite Prinzip erlaubt keine Bestimmung der Bruttogeschwindigkeit. Die Bestimmung der Enzymaktivität ergibt sich hier aus einem Vergleich der Reaktionsproduktkonzentrationen, die durch unbekannte Enzymkonzentrationen und durch bekannte Konzentrationen eines Bezugenzyms hervorgerufen werden: Man läßt bekannte Konzentrationen eines Bezugenzyms unter den gleichen Bedingungen wie die zu untersuchende Enzymaktivität reagieren. Das kinetische Verhalten des Referenzenzyms und des zu bestimmenden Enzyms sollte gleichartig oder mindestens

sehr ähnlich sein. Unter diesen Bedingungen wird der systematische Fehler der Eichung so klein wie möglich gehalten (17).

Im folgenden wird über ein vollautomatisches Verfahren zur Bestimmung saurer proteolytischer Enzymaktivitäten berichtet. Dieses Verfahren entspricht dem oben dargestellten zweiten Prinzip. Es handelt sich um eine Verbesserung der von BROKATE (3) angegebenen diskontinuierlichen Modifikation der ANSON (1a) Methode zur Bestimmung der sauren proteolytischen Enzymaktivität. Die Verbesserung der automatischen, kontinuierlichen Methode mußte eine Empfindlichkeitssteigerung etwa um den Faktor 10 bringen, da bei der Säulenchromatographie Verdünnungen der proteolytischen Aktivität bis zu 0,2 µg/ml Schweinepepsinogen zu erwarten sind. Die von BROKATE (3) angegebene Methode erfaßt die Parahydroxygruppen der aromatischen Aminosäuren in den Spaltprodukten. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei 2 Mikrogramm Tyrosin/ml.

Die Spaltprodukte bieten auf Grund ihrer Konstitution die Möglichkeit, sie durch eine weitere simultan ablaufende colorimetrische Messung zu erfassen. Nach FOLIN-LOWRY (10a, 21) kann neben den Parahydroxygruppen die Peptidbindung durch ein modifiziertes Biuret-Reagenz erfaßt werden. Da sowohl die Reaktion nach FOLIN-CIOCALTEU als auch die modifizierte Biuret-Reaktion nach FOLIN-LOWRY an den gleichen Substratbruchstücken gleichzeitig ablaufen, ist eine Empfindlichkeitsstei-

gerung zu erwarten. Diese Möglichkeit ist in dem folgenden automatischen Verfahren ausgenutzt. Die Eignung des Verfahrens für Serien-Analysen (20 Proben/h) wird am Beispiel säulenchromatographischer Fraktionierungen von sauren proteolytischen Enzymaktivitäten gezeigt. Die saure proteolytische Aktivität von nativem Magensaft und die im menschlichen Harn ausgeschiedenen sauren proteolytischen Proenzyme werden mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an Ecteola-Cellulose und DEAE-Sephadex und mit Hilfe der Gelchromatographie an Sephadex-G 200 untersucht.

Methode

Grundlage: Die zu bestimmende proteolytische Enzymaktivität wirkt bei geeigneter Wasserstoffionenkonzentration auf Hämoglobin als Substrat ein. Ein Teil der entstehenden Spaltprodukte des Hämoglobins wird anschließend durch Dialyse abgetrennt. Im Dialysat werden die Spaltprodukte als Folin-Lowry-positives Material erfaßt. Die einfachsten kinetischen Bedingungen ergeben sich, wenn die Substratkonzentration im Bereich des Substratoptimum liegt. Es kann aber auch bei suboptimaler Substratkonzentration gearbeitet werden, da die zu bestimmende Enzymaktivität mit der Aktivität eines Bezugenzyms verglichen wird.

Apparatur

Das System stellt eine Kombination von Autoanalyzer-Ele-

menten dar.

Fließdiagramm

Ein Fließdiagramm ist in der Abbildung 3 wiedergegeben

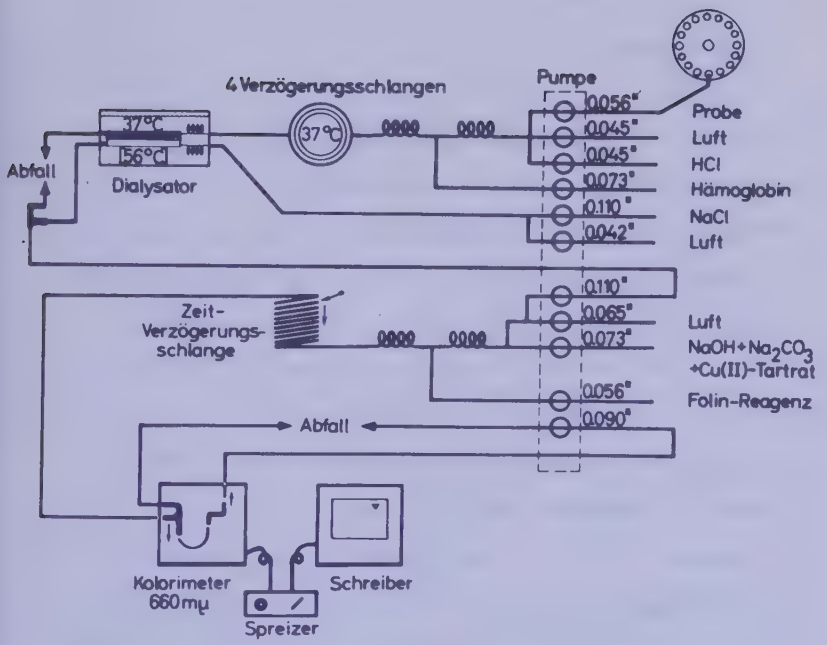

Abbildung 3: Fließdiagramm des automatischen Bestimmungsverfahren für saure proteolytische Enzymaktivitäten.

Reagentien

1. 0,217 N und 0,290 N HCl

2. Hämoglobinlösung 0,5 g/100 ml

   Herstellung: 15 g Hämoglobin (Hemoglobin Substrate, Salt free, Nr. 2382, Mann Res.Lab., New York) werden mit etwa 500 ml bidestilliertem Wasser vorsichtig angerührt und auf 3,0 l mit bedestilliertem Wasser aufgefüllt. Nach 30 Minuten wird die Lösung auf einer Nutsche abgesaugt (Filter Schleich & Schüll Nr. 595) Anschließend wird die Lösung bei 5° - 10° C für 30 Minuten bei 1300 g zentrifugiert. Nach Dekantieren wird die Lösung bei $+4^{\circ}$ C aufbewahrt und ist dort 24 Stunden haltbar.

3. Natriumchloridlösung 0,9 g/100 ml H_2O

4. Alkalische Cu-Tartrat-Lösung

   Herstellung der Lösung:

   Lösung I: 0,75 g $CuSO_4 . 5H_2O$ p.A./300 ml H_2O

   Lösung II: 2,25 g K-Na-Tartrat . 4 H_2O p.A. und 60 g Na_2CO_3 wasserfrei p.A. werden mit 0,6 N NaOH auf 2700 ml aufgefüllt.

   Jeweils 100 ml der Lösung I werden zu 900 ml Lösung II zugesetzt und ergeben so die "Alkalische Cu-Tartrat-Lösung".

5. Folin-Reagenz

   Hergestellt nach Folin-Ciocalteu nach Vorschrift:

HOPPE-SEYLER, THIERFELDER, Physiol. und physiol. chem. Analysen, 10. Auflage III/1, S. 600 (26).

Man löst in einem Rundkolben:

700 ml H_2O (deionisiert)

100 g $Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$ (Nr. 6673)

100 g $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (Nr. 6521)

zu diesem Gemisch gibt man zunächst:

50 ml 85 %ige Phosphorsäure (Nr. 573), dann

100 ml HCl (min. 32 % Nr. 319)

Das Ganze wird am Rückflußkühler unter dem Abzug 10 Stunden lang gekocht. In die warme Lösung gibt man 150 g Lithiumsulfat (Nr. 5695), 50 ml H_2O und einige Tropfen Brom (Nr. 1948). Nun kocht man die Mischung 15 Minuten lang ohne Kondensator, um das überschüssige Brom zu entfernen. Nach dem Abkühlen verdünnt man auf 1 l und filtriert mit Filter 602 (Hart). Das Reagenz sollte keine grünliche Farbe haben. Ist das der Fall, so kann mit einigen Tropfen erneut zugesetzten Broms die Lösung wieder aufoxydiert werden.

Die fertige Folin-Lösung wird zur Messung auf eine Endverdünnung 1 : 3 gebracht (d.h. 1 Teil Folin-Reagenz + 2 Teile H_2O).

Filter: 660 mμ

pH-Wert:

Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird bei vorgegebener Wasserstoffionenkonzentration und Ionenstärke der Proben-

flüssigkeit durch die Konzentration der im Testsystem hinzugefügten HCl festgelegt. Um eine konstante Wasserstoffionenkonzentration zu erreichen, muß im Intervall zwischen zwei Aspirationen von Probe durch den für die Luftzufuhr vorgesehenen Pumpenschlauch ein geeigneter Na-Acetat-Essigsäure-Puffer von gleichem pH-Wert aspiriert werden. Man erreicht dies in üblicher Weise durch einen Doppelbügel am Probennehmer.

Eichlösungen:

Pepsin oder Pepsinogen (0,5 - 5,0 µg/ml, 1 m Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6).

Empfindlichkeit:

Es können in diesem Testsystem noch Pepsin- bzw. Pepsinogenkonzentrationen von 0,15 µg/ml erfaßt werden. Die Reproduzierbarkeit entspricht $\pm$ 0,1 µg/ml im Meßbereich zwischen 0,5 - 5 µg/ml Pepsin bzw. Pepsinogen.
In den zu analysierenden Proben darf ebenso wie in den Bezugsystemen kein bei +56° C dialysables Folin-Lowry-positives Material enthalten sein. Andernfalls ist eine Leerwertbestimmung erforderlich. Diese Leerwertbestimmung erfolgt im gleichen System unter Ersatz des Substrates durch 0,9 %ige NaCl-Lösung. Gleichzeitig muß die HCl Konzentration herabgesetzt werden, um in dem veränderten Inkubationsstrom den gleichen pH zu erhalten. Die Leerwerte werden auf Tyrosin bezogen. Diese Tyrosinäqui-

valente werden von den ebenfalls in Tyrosinäquivalenten zu messenden Reaktionsproduktkonzentrationen subtrahiert.

Analysengeschwindigkeit:

Der Probennehmer wird auf 40/h eingestellt und mit einer alternierenden Reihe von Proben und 0,1 m Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6 besetzt.

Eichkurven:

Je eine Eichkurve für Pepsinogen (0,5 - 5 µg/ml) für Pepsin (0,5 - 5 µg/ml) und Tyrosin (50 - 200 µg/ml) ist in den Abbildungen (4, 5, 6) wiedergegeben.

Bei der Ausführung von Messungen mit dem beschriebenen System sind folgende Störungsmöglichkeiten zu beachten:

1. Übertragungseffekt
   Nach einer Meßprobe mit großer proteolytischer Aktivität hat es sich als zweckmäßig erwiesen, mit zwei Proben Na-Acetat-Puffer nachzuspülen, statt der sonst üblichen Nachspülung mit einer Na-Acetat-Puffer-Probe, da sonst der zweite Meßwert dem ersten aufgelagert werden kann. Ein Beispiel zeigt die Abbildung 7.

2. Störung durch Luftblasen
   Die Luftsegmentierung des Reaktionsgemisches ist in Autoanalyzer-Systemen unerläßlich. Erst vor Eintritt in die Küvette des Kolorimeters ist die Luftsegmentierung durch vollständige Ableitung der Luftblasen

zu beseitigen. Falls Luftblasen nicht durch das zu ihrer Beseitigung vor der Küvette eingesetzte T-Stück entfernt werden, treten sie in die Küvette ein und verursachen während ihres Durchtrittes Extinktionsveränderungen, meist ergeben sich sprunghafte Extinktionszunahmen wie es in Abbildung 8 zu sehen ist.

3. Verhalten der Nullinie

a) langsamer Nullinienanstieg

Wenn das System längere Zeit gespült worden ist, beobachtet man beim Anfahren einer Messung einen langsamen Anstieg der Nullinie. Es bildet sich dabei wahrscheinlich ein feiner Beschlag an der Küvetteninnenwand. Nach einiger Zeit erreicht die Nullinie wieder einen konstanten Wert. Es hat sich möglicherweise ein Absorptions-Desorptions-Gleichgewicht eingestellt. Es handelt sich um eine konstante Extinktion durch den Niederschlag an der Küvettenwand (Abbildung 9).

b) Nullinienschwankung

Die in Abbildung 10 gezeigte Nullinie schwankt erheblich. Eine ideale Nullinie ist eine Gerade. Die Schwankungen der hier gezeigten Nullinie sind möglicherweise die Folge einer mangelhaften Mischung im Fließsystem.

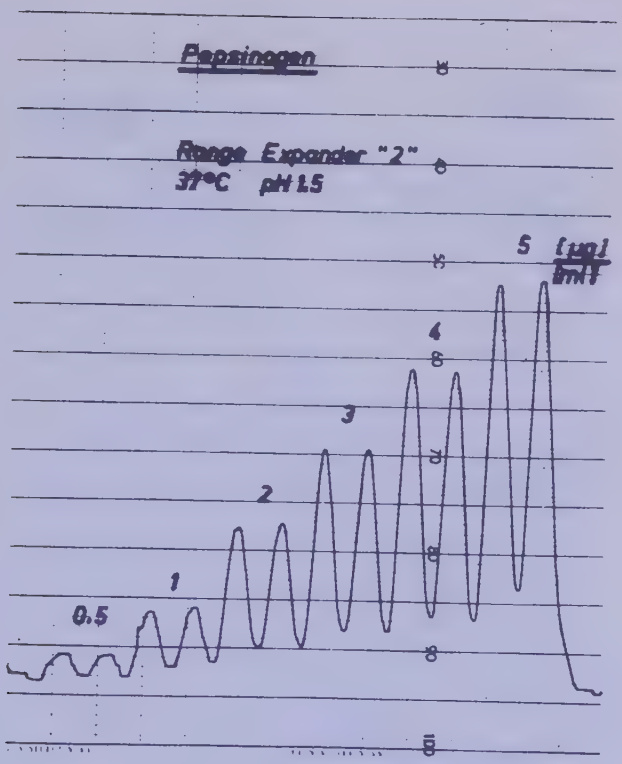

Abbildung 4: Originaldiagramm einer Pepsinogen-Eichreihe (Aktivitätsmessung bei pH 1,5).

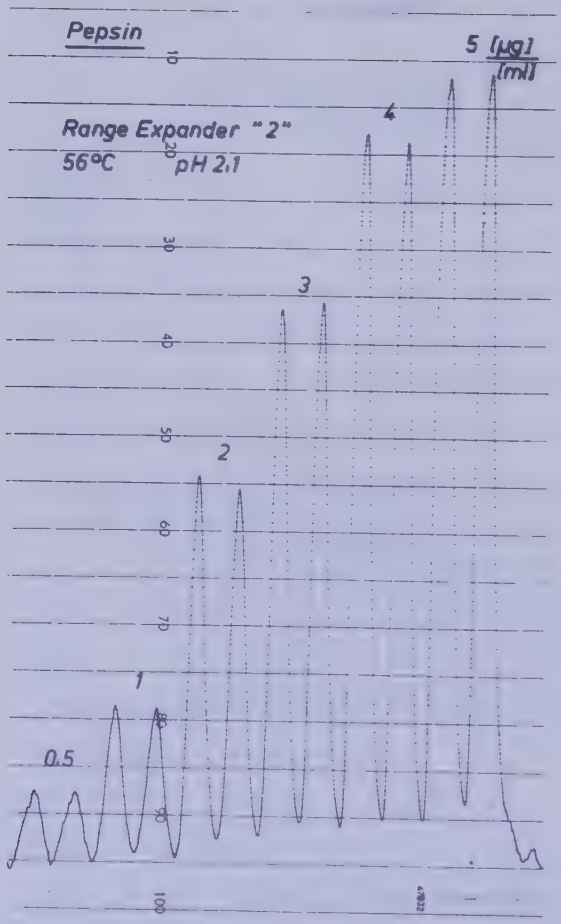

Abbildung 5: Originaldiagramm einer Pepsin-Eichreihe (Aktivitätsmessung bei pH 2,1).

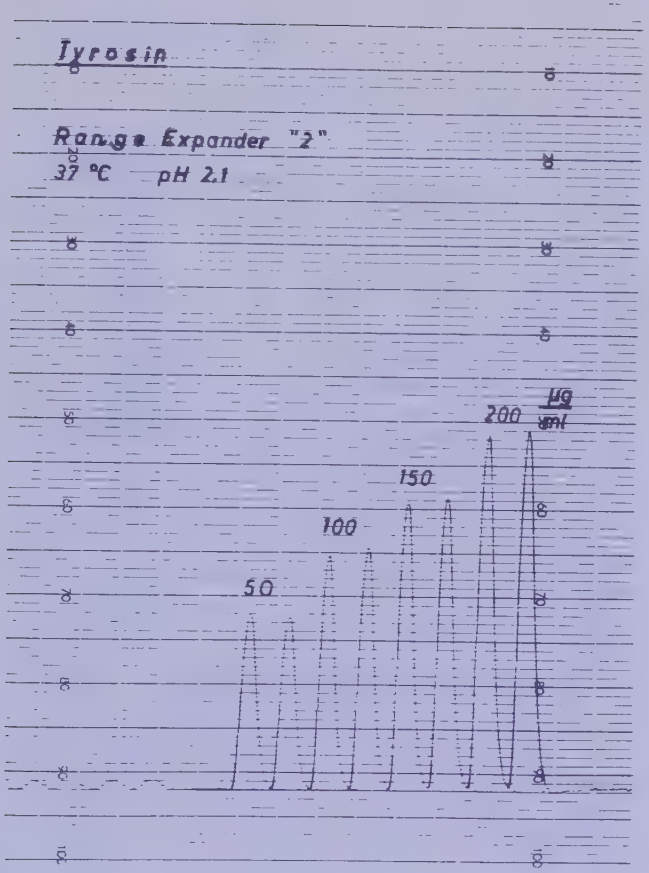

Abbildung 6: Originaldiagramm einer Tyrosin-Eichkurve.

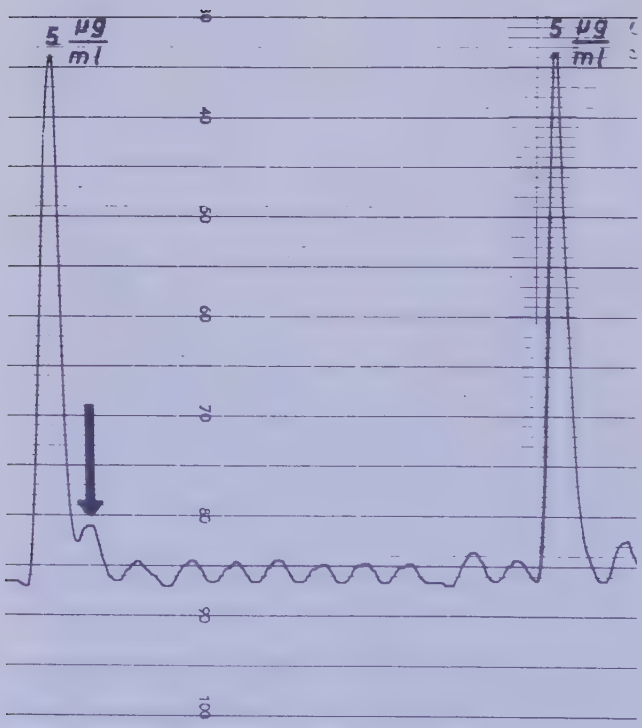

Abbildung 7: Originaldiagramm aus einer Messung einer Harnfraktionierung zeigt den bei Beginn einer Meßreihe zu beobachtenden Übertragungseffekt (mit Pfeil markiert).

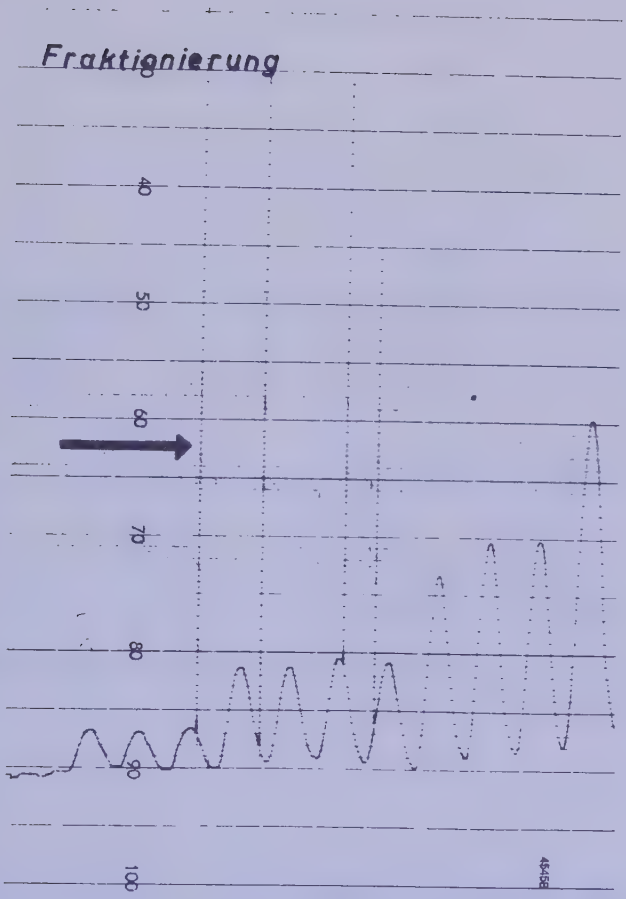

Abbildung 8: Originaldiagramm aus der Messung einer Harnfraktionierung zeigt eine Meßstörung durch Luftblasen (mit Pfeil markiert).

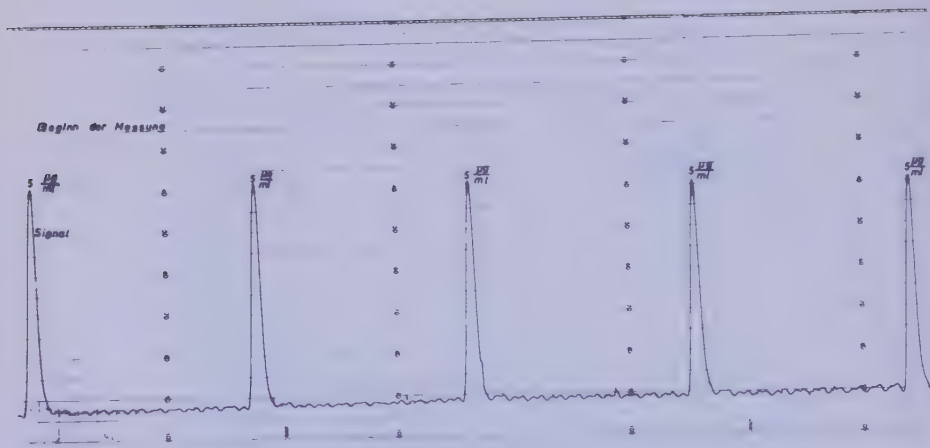

Abbildung 9: Originaldiagramm aus der Messung einer Harnfraktionierung. Die Abbildung zeigt den am Beginn einer Meßreihe zu beobachtenden Nullinienanstieg.

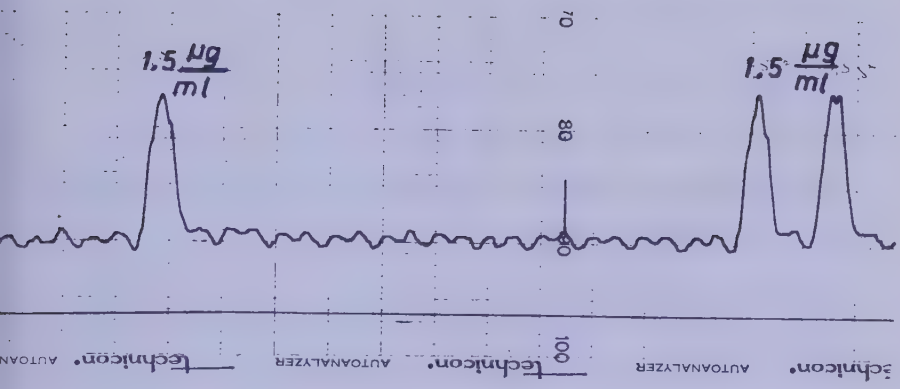

Abbildung 10: Nullinienschwankung als mögliche Folge einer mangelhaften Mischung im Fließsystem.

Beispiele für die Anwendung der Methode

Abbildung 11 zeigt die vollständige Messung einer Fraktionierung der sauren proteolytischen Proenzyme, die im Harn eines gesunden Probanden enthalten sind. Es wurde an einer DEAE-Sephadex-Säule in 0,1 m Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6 mit dem in der Abbildung 12 wiedergegebenen linearen NaCl-Gradienten bei +5° C eluiert. Vor dem Aufbringen auf die Säule wurde die proteolytische Enzymaktivität durch Ultrafiltration angereichert (3). Die proteolytische Aktivität wurde bei pH 2,1 mit der oben angegebenen Methode bestimmt. Als Bezugsenzym diente eine Schweinepepsinogenpräparation. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der oben abgebildeten Fraktionierung.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis einer weiteren, unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Fraktionierung der sauren proteolytischen Proenzyme des menschlichen Harnes. Bei der Abbildung 14 zugrundeliegenden Messung wurde die Aktivität bei pH 1,5 mit der oben angegebenen Methode bestimmt.

Abbildung 15 zeigt eine Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität von nativem Magensaft eines gesunden Probanden an einer Ecteola-Cellulose-Säule. Die Elution erfolgte in 0,1 m Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6 mit dem in der Abbildung wiedergegebenen linearen

NaCl-Gradienten bei +5° C. Die proteolytische Aktivität wurde bei pH 2,1 mit der oben angegebenen Methode bestimmt. Als Bezugsenzym diente Schweinepepsin, das zweimal kristallisiert war.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel der Methode ist die Verteilungschromatographie saurer proteolytischer Enzymaktivitäten an Sephadex-G-200-Gel. Abbildungen 16, 17 zeigen das verteilungschromatographische Verhalten der sauren proteolytischen Enzymaktivität von nativem Magensaft und der aktivierten sauren proteolytischen Aktivität des Harnes an Sephadex-G-200-Gel. Die Elution erfolgte mit 1,0 m NaCl in 0,1 m Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6. Die proteolytische Enzymaktivität wurde mit der oben angegebenen Methode bei pH 2,1 gemessen. Als Bezugsenzym diente zweimal kristallisiertes Pepsin. Aus dem Eluatvolumen (Ve) und dem inneren und äußeren Volumen (Vi und Vo) des Gels ergibt sich der Verteilungskoeffizient k_D = (Ve - Vo) / Vi. Er liefert nach PORATH (25) eine Abschätzung des Molekulargewichtes. Die hierzu notwendige Eichung der Säule durch Verteilungschromatographie von Proteinen bekannten Molekulargewichtes erfolgte in Anlehnung an WIELAND (42). Für die beiden untersuchten Enzymaktivitäten ergab sich ein Molekulargewicht von 33000 $\pm$ 3000 (33, 26).

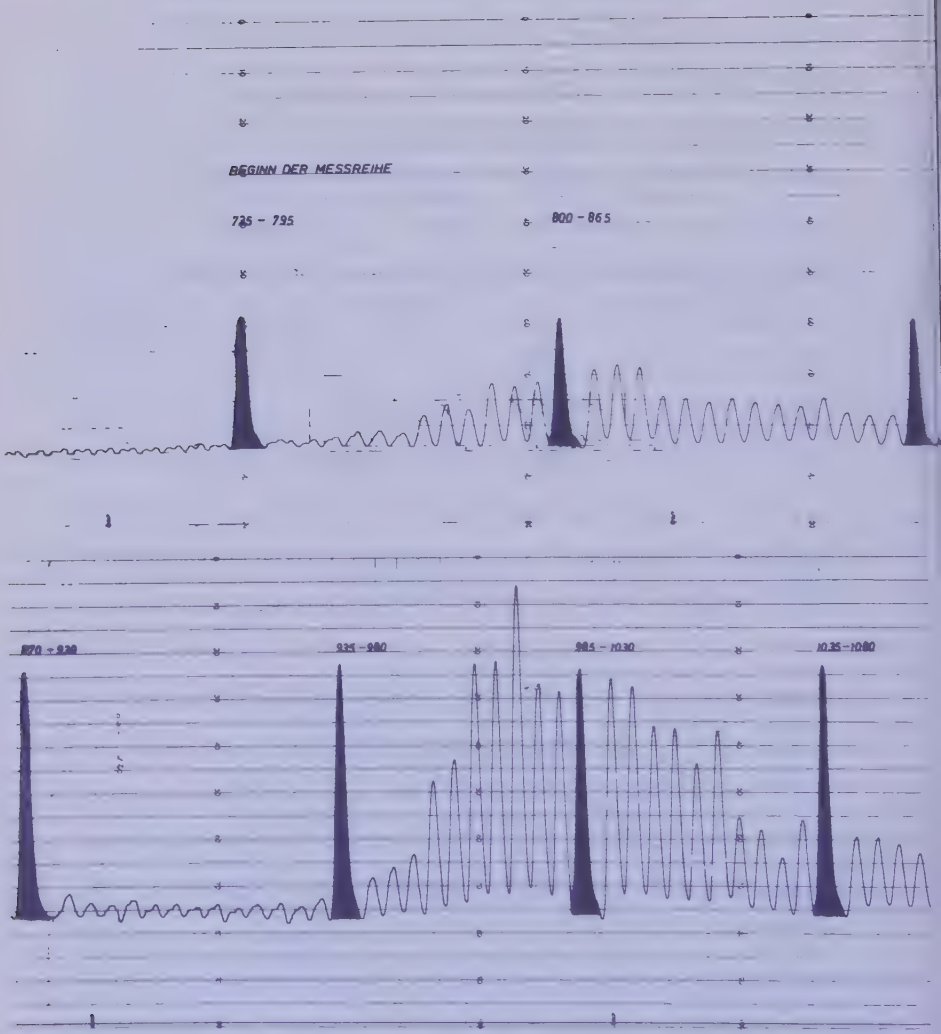

Abbildung 11: 1. Teil des vollständigen Originaldiagramms einer Uropepsinogenfraktionierung (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1). Die Auswertung ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Zwischen 2 Signalen (ausgefüllte Peaks) sind 10 Meßwerte in Fünfer-Abständen.

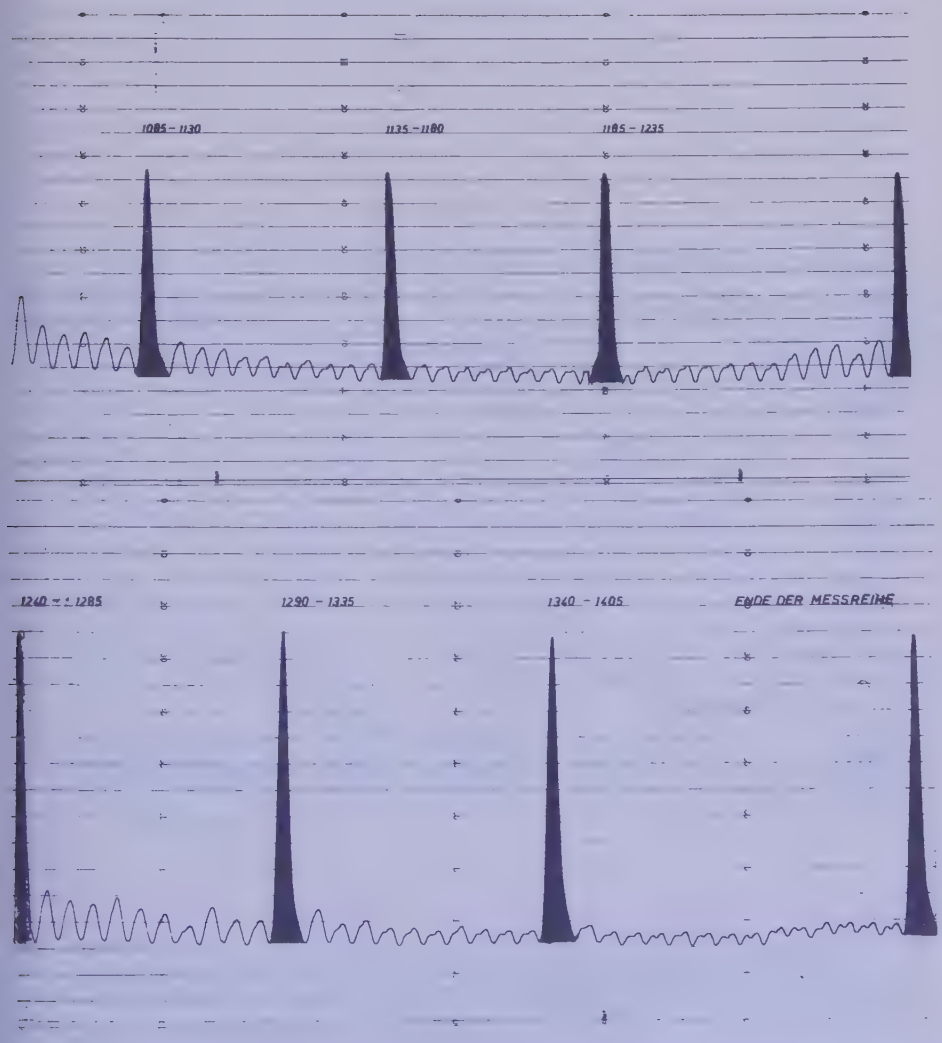

Abbildung 11: 2. Teil des vollständigen Originaldiagramms einer Uropepsinogenfraktionierung.

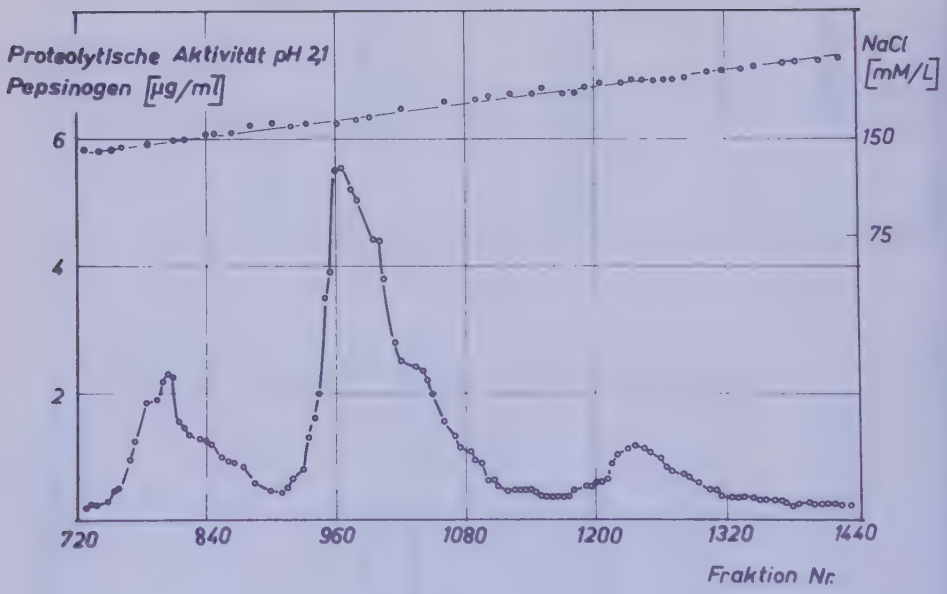

Abbildung 12: Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes an einer DEAE-Sephadex-Säule (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1).
Linke Ordinate : Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen.
Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/l.
Abszisse : Fraktion Nr.

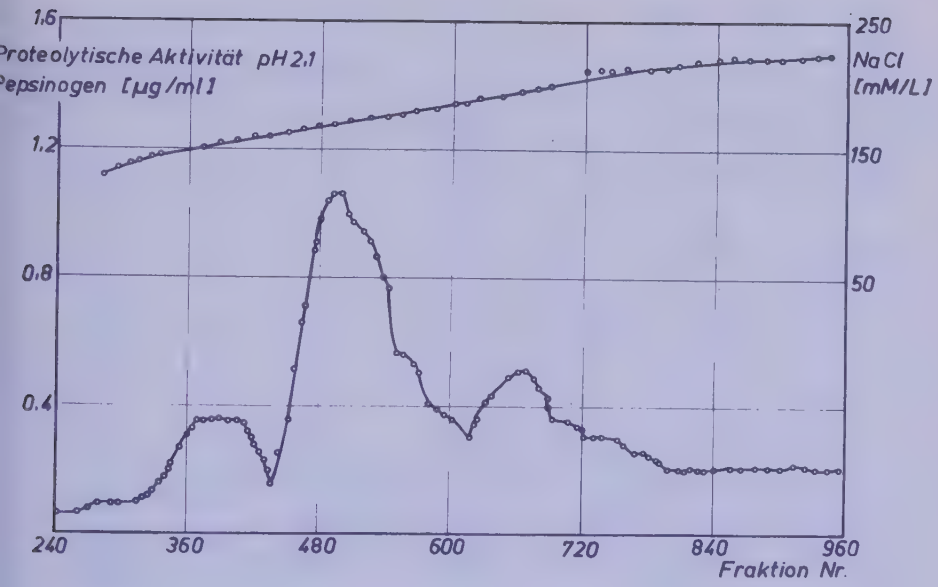

Abbildung 13: Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes an einer DEAE-Sephadex-Säule (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1).
Linke Ordinate : Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen.
Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/l.
Abszisse : Fraktion Nr.

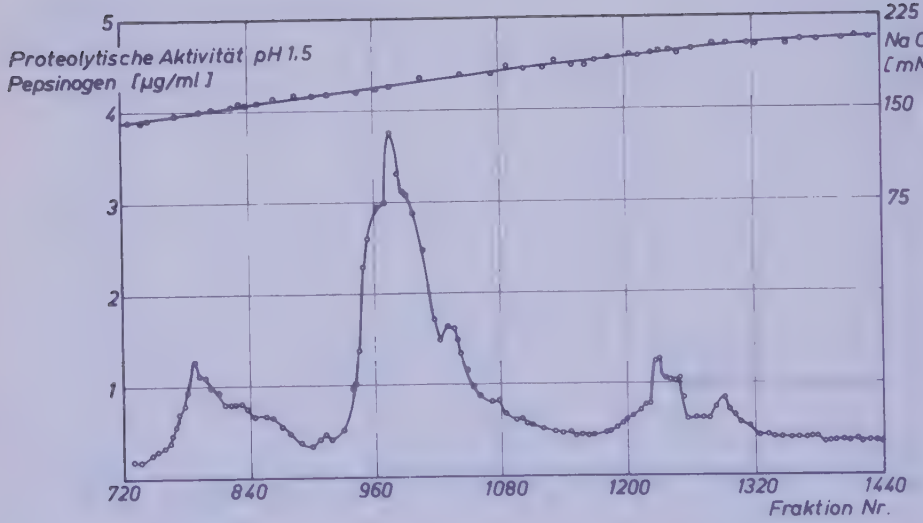

Abbildung 14: Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes an einer DEAE-Sephadex-Säule (Messung der Enzymaktivität bei pH 1,5).
Linke Ordinate : Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen.
Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration in mM/
Abszisse : Fraktion Nr.

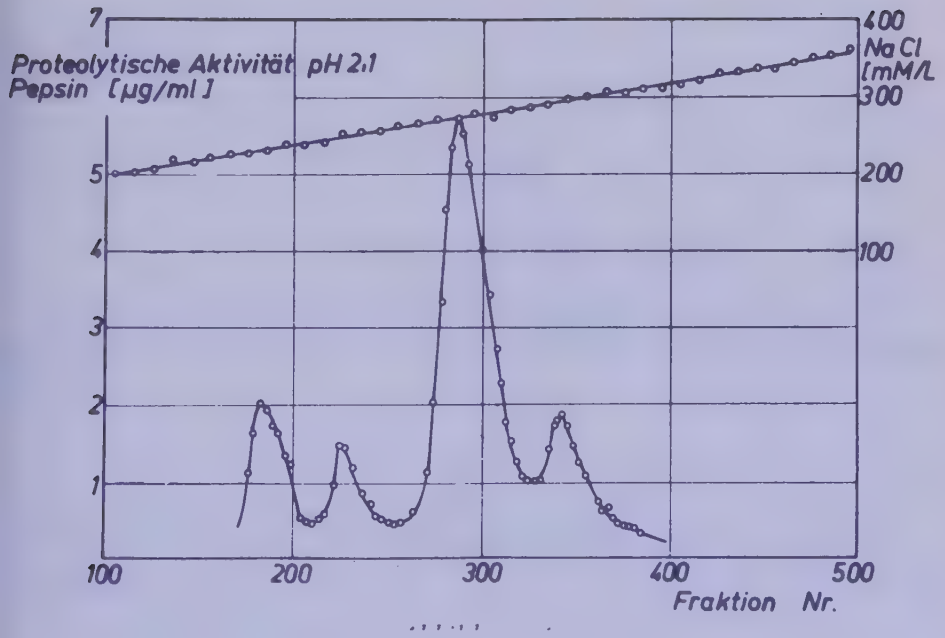

Abbildung 15: Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität von menschlichem Magensaft an einer Ecteola-Cellulose-Säule, Aktivitätsmessung bei pH 2,1.

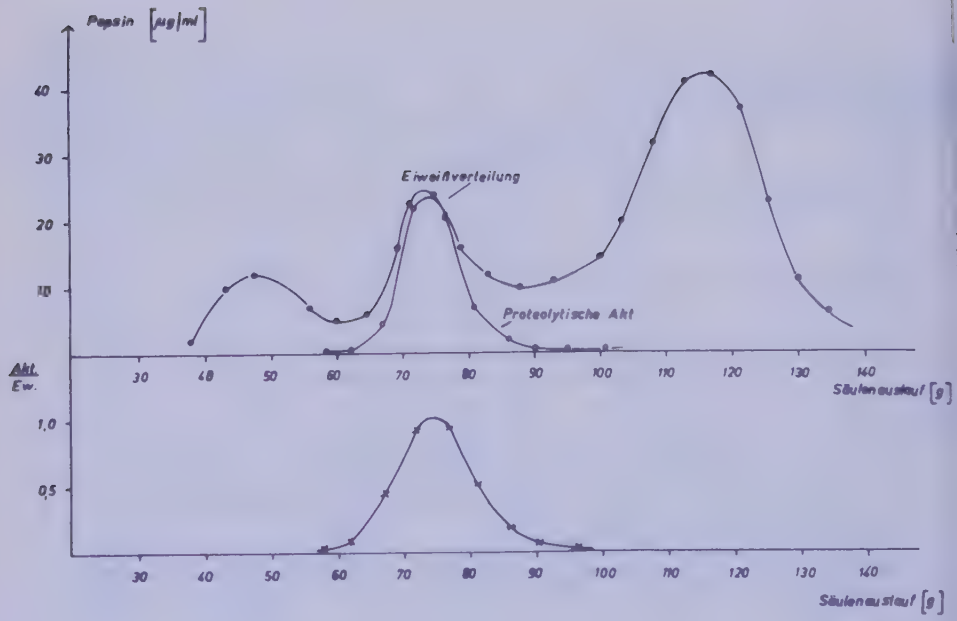

Abbildung 16: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Magensaft gewonnen an Sephadex G 100.

Die Ordinate gibt die EW-Konzentration sowie die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml wieder, die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm. In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse dargestellt.

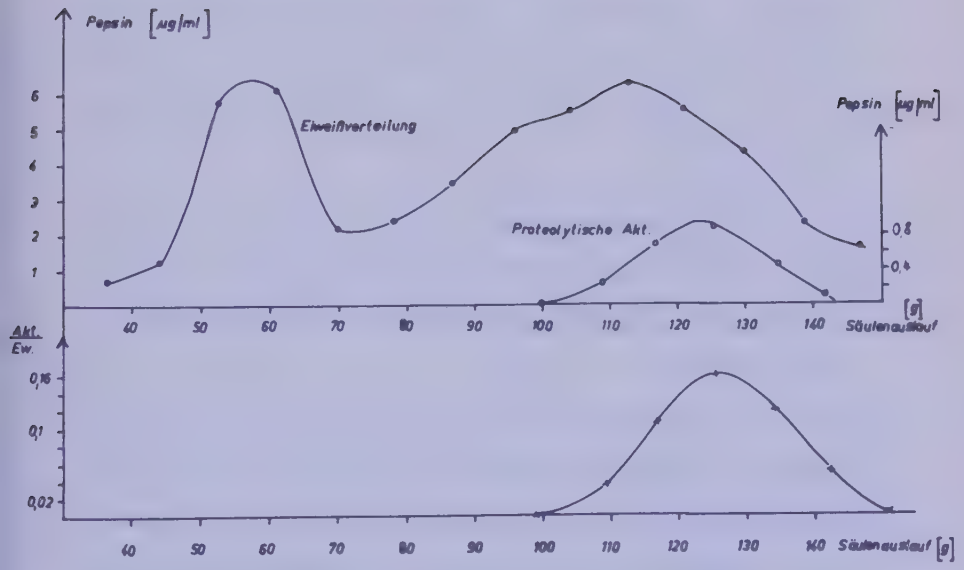

Abbildung 17: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Harnproteinkonzentrat, gewonnen an Sephadex G 200.

Die linke Ordinate stellt die EW-Konzentration, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml dar.
Die rechte Ordinate die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml.
In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse wiedergegeben.

Diskussion

Es sind zwei Wege zur Bestimmung der Spaltproduktkonzentration der sauren Proteolyse möglich:

1. Es werden die Proteine in einer geeigneten Reaktion markiert (Einbau von J^{131} oder Anlagerung von Azogruppen). Diese Gruppen finden sich in den Spaltprodukten wieder und gestatten somit eine Konzentrationsbestimmung derselben.

2. Die Reaktionsprodukte der sauren proteolytischen Aktivität werden ohne vorherige Markierung nach der Spaltung erfaßt. Hierzu können photometrische Methoden verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine kontinuierliche Methode (nach FOLIN-LOWRY) zur Bestimmung der sauren proteolytischen Aktivität beschrieben. Es ist dabei der unter 2. angedeutete Weg gewählt. Gegenüber der Bestimmung der sauren proteolytischen Aktivität nach FOLIN-CIOCALTEU stellt dieser Aktivitätstest einen Fortschritt dar. Es werden nicht nur die Parahydroxygruppen der aromatischen Aminosäuren, sondern auch die Peptidbindungen der Spaltprodukte erfaßt. Die zusätzlich Farbreaktion bringt eine Empfindlichkeitssteigerung um das 10fache. Die Eichung geschieht durch Vergleich mit einem bekannten proteolytischen Enzym, dem Schweinepepsinogen. Ein

solcher Maßstab ist streng gültig, wenn die kinetischen Konstanten beider Enzyme identisch sind. Ein solcher Vergleich ist annähernd gültig, wenn die kinetischen Eigenschaften der zu vergleichenden Enzyme ähnlich sind, es ist dann aber erforderlich, die Aktivitäten beider Enzyme auf eine proteolytisch nicht weiter veränderbare, im Reaktionsgemisch meßbare Substanz zu beziehen. Die Reaktionsproduktkonzentrationen des Enzyms und des Referenzenzyms werden in Äquivalenten einer Bezugssubstanz (Tyrosin) ausgedrückt, die in dem Reaktionsgemisch in gleicher Weise wie die Spaltprodukte erfaßt wird. Das Ergebnis dieser Messungen sollte eine lineare Beziehung zwischen beiden Enzymkonzentrationen ergeben. Darüber hinaus kann die Reproduzierbarkeit durch wiederholte Eichkurven bewiesen werden.

Bei den diskontinuierlichen Verfahren wird die Proteolyse durch "Fällung" mit Trichloressigsäure gestoppt. Streng genommen handelt es sich aber um eine Fraktionierung, denn die Zahl der trichloressigsäurelöslichen Spaltprodukte nimmt mit steigender Konzentration der Trichloressigsäure ab. Da sich die von den einzelnen Autoren zur "Fällung" verwandten Trichloressigsäurekonzentrationen unterscheiden, ist ein Vergleich der Untersuchungsergebnisse nur bedingt möglich.

Die vollautomatischen Verfahren verwenden Dialysemembranen, welche die Spaltprodukte auf Grund ihrer Permeabilität trennen. Es wird somit eine Molekularge-

wichtsverteilung der Spaltprodukte geschaffen, deren oberer Bereich durch die Porengröße der Membranen bestimmt wird. Die Standardisierung eines Testes der sauren proteolytischen Aktivität erscheint über einheitliche Membranen leichter möglich als über die Festlegung einer bestimmten Trichloressigsäurekonzentration.

Den Methoden zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität nach FOLIN-LOWRY und FOLIN-CIOCALTEU haftet ein beachtlicher Mangel an: Die bei der Proteolyse erzeugten Spaltprodukte sind für weitere Untersuchungen nicht mehr verwendbar. An ihre Stelle könnten Nachweisverfahren treten, die eine weitere Untersuchung der Spaltprodukte gestatten.

Das Absorptionsverfahren nach O. WARBURG und W. CHRISTIAN (40) beruht auf der Anregung benzoider Strukturen (aromatischen Aminosäuren) durch uv-Licht bei 260 und 280 Nanometer. Es gestattet die Bestimmung von Peptidbruchstücken in Abhängigkeit von ihrem Gehalt an aromatischen Aminosäuren.
Gegenüber dem Folin-Lowry-Verfahren ist allerdings zu erwarten, daß die Empfindlichkeit um den Faktor 10 bis 20 geringer ist. Die analytische Nachweisgrenze liegt somit etwa im Bereich des Folin-Ciocalteu-Verfahrens.
Ein Absorptionsverfahren wäre geeigneter für die kinetische Analyse, da die Spaltprodukte noch für weitere Untersuchungen, wie z.B. für die Gelchromatographie zur

Verfügung stünden. Diese Analyse könnte eine Trennung der Spaltprodukte nach Molekulargröße ermöglichen. Zusammen mit einer Sequenzanalyse wären so die Angriffspunkte der Protease am Substrat erkennbar.
Eine weitere Möglichkeit zur näheren Charakterisierung der untersuchten Enzyme ergäbe sich aus der Verwendung eines synthetischen Substrates. Das hochmolekulare Substrat Hämoglobin ist zwar optimal für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität, will man aber eine einfache Charakterisierung der Enzyme vornehmen, so muß man mit niedermolekularen synthetischen Substraten arbeiten, um die abgespaltenen Aminosäuren einzeln erfassen zu können. Die Frage nach der Wahl des Substrates bei der Bestimmung proteolytischer Enzymaktivitäten, soll in der Dissertation Buachantara behandelt werden.

Die Ergebnisse der Fraktionierungen der sauren proteolytischen Enzymaktivitäten von menschlichem Magensaft und Harn an DEAE-Sephadex sind ausführlich von THEISS (38) diskutiert worden. Bezüglich einer eingehenderen Diskussion der Ergebnisse der Gelfiltration saurer proteolytischer Enzymaktivitäten an Sephadex-G-100 und 200 ist auf SIEWERS (33) zu verweisen.

Zusammenfassung

1. Es wird eine vollautomatische Bestimmung der sauren proteolytischen Aktivität des Harnes und Magensaftes beschrieben, die auf dem analytischen Prinzip der Folin-Lowry-Methode beruht.

2. Es wird gezeigt, daß diese Methode die Bestimmung von sauren proteolytischen Aktivitäten in geringen Konzentrationen erlaubt, die 0,5 - 10 µg Schweinepepsinogen pro ml entsprechen.

3. Die Brauchbarkeit der Methode zur Bestimmung saurer proteolytischer Enzymaktivitäten im Eluat säulenchromatographischer Fraktionierungen wird durch Anwendungsbeispiele belegt (Gelfiltration an Sephadex-G-100 und 200 so-wie an Ecteola-Cellulose und DEAE-Sephadex durchgeführte Fraktionierungen der sauren proteolytischen Enzymaktivität von nativem menschlichem Magensaft ("Pepsin") und der sauren proteolytischen Proenzyme aus menschlichem Harn ("Uropepsinogen") nach Anreicherung durch Ultrafiltration).

Literaturverzeichnis

1) AGNE, H. — Inauguraldissertation Med. Fakultät d. Universität d. Saarlandes (1969)

1a) ANSON, M.L. and MIRSKY, A.I. — J. Gen. Physiol. 16, 59 (1932)

2) BENDERSKY, J. — Virchows Arch. patholog. Anat. 121, 554 (1890)

3) BROKATE, W. — Inauguraldissertation Med. Fakultät d. Universität d. Saarlandes (1966)

4) Von BRÜCKE, E. — Sitzungsbericht Akd. wissensch., Math.-naturwiss. Klasse 43, 601 (1861)

5) BUCHS und FREUDENBERG — Biochem Z. 325, 44 - 52 (1953)

6) Van CALCKAR, P.P. — Arch. ges. Physiolog. 148, 257 (1912)

7) FREIS, A. und LEPPLA, W. — Klin. Wschr. 41, 1161 (1963)

8) FREIS, A. — Inauguraldissertation Med. Fakultät d. Universität d. Saarlandes (1965)

9) FROUIN, A. — Comptes rend.Soc. biol. 56, 204 (1904)

10) FULD, E. und HIRAYAMA, K. — Berlin. Klin. Wschr. 47, 1062 (1912)

10a)	FOLIN, A. and CIOCALTEU, V.	J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)
11)	GOTTLIEB, E.	Skand. Arch. Physiol. 46, 1 (1924)
12)	GRÜTZNER, P.	Pflüger's Arch. ges. Physiol. 8, 452 (1874)
13)	HERNANDEZ, M.H.	Acta pediatr. espaniol. 23, 1083 (1965)
14)	HIRSCHOWITZ, B.I.	Physiol. Rev. 37, 475 (1957)
15)	HIRSCHOWITZ, B.I., STREETEN, D.H.P., LONDON, J.A. and POLLARD, H.M.	J. Clin. Invest. 36, 1171 (1957)
16)	JANOWITZ, H.D. and HOLLANDER, F.	J. Appl. Physiol. 4, (1951)
17)	KELLER, H.E., SUTTER, H. HOFFSÜMMER, B., LEPPLA, W.	Sonderdruck 451: Automation in der analytischen Chemie (1965) Technikon G.m.b.H., Frankfurt/M.
17a)	KELLER, H.E., AGNE, H., MANNEBACH, H., LEPPLA, W.	Enzymes in Urine and Kidney 280, S. 265 (1968) Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart
18)	KUSHNER, I., RAPP, W. and BURTIN, P.	J. clin. Invest. 43, 1983 (1964)

19) LEPPLA, W., FREIS, A., BROKATE, W., HOFFSÜMMER, B. und KELLER, H.E.
Normale und pathologische Funktionen des Nierentubululus
3. Symposion der Gesellschaft für Nephrologie (1964)
Hans Huber, Bern und Stuttgart

20) LEPPLA, W., THEISS, H., WEIDLER, K., SUTTER, H. und KELLER, H.E.
Aktuelle Probleme der Nephrologie, S. 466
4. Symposion der Gesellschaft für Nephrologie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966

21) LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

22) MATHES, M.
Arch. exp. Path. Pharmakol. 49, 107 (1903)

23) MÜLLER, W.A.
Dtsch. Med. Wschr. 84, 84 (1959)

24) PAPPENHEIMER, J.R.
Klin. Wschr. 33, 362 (1955)

25) PORATH, J.
Pure appl. Chem. 6, 233 (1963)

26) SEIJFFERS, M.J., MILLER, L.L. and SEGAL, H.L.
J. Amer. Med. Assoc. 183, 102 (1963)

27) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L.
Am. J. Physiol. 205, 1099 (1963)

28) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. — Am. J. Physiol. 205, 1106 (1963)

29) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. — Am. J. Physiol. 206, 1106 (1964)

30) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. — Biochemistry 3, 1 (1964)

31) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. — Biochemistry 3, 1203 (1964)

32) SEIJFFERS, H.J., TURNER, M.D., MILLER, L.L. and SEGAL, H.L. — Gastroenterology 48, 122 (1965)

33) SIEWERS, I. — Inauguraldissertation Med. Fakultät d. Universität d. Saarlandes (1969)

34) TANG, J.S., CAPUTTO, W.R. and TRUCCO, R.E. — J. biol. Chem. 234, 1174 (1959)

35) TANG, J.S. and TANG, K.I. — J. biol. Chem. 238, 606 (1963)

36) TAYLOR, H.W. — Biochem. J. 71, 73, 373, 384, 626 (1959)

37) TAYLOR, H.W. — Gastroenterology 40, 823 (1961)

38) THEISS, H. Inauguraldissertation Med. Fakultät d. Universität d. Saarlandes (1969)

39) TURBA, F. Advances in Enzymology 22, 417 (1960)

40) WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. Biochem. Zschrift. 310, 384 (1941)

41) WEST, P.M., ELLIS, F.W. and SCOTT, B.L. J. Lab. & Clin. Med. 39, 159 (1952)

42) WIELAND, T., DUESBERG, P., DETERMANN, H. Biochem. Z. 337, 303 - 311 (1963)

Herrn Prof. Dr. F. D o e n e c k e , Direktor der I. Medizinischen Universitätsklinik danke ich für die Möglichkeit der Arbeit an seiner Klinik.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. L e p p l a danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dipl.-Chemiker Dr. rer. nat. H.-E. K e l l e r danke ich vielmals für die ständige Beratung und Unterstützung mit der er diese Arbeit gefördert hat.

Lebenslauf

Am 7. Dezember 1939 wurde ich in Hofheim, als erstes Kind des Ehepaares Jakob und Luise Weidler geboren. Mit 6 Jahren besuchte ich die Volksschule. Nach dem 6. Schuljahr wechselte ich zum späteren Staatl. Math.-Naturw. Gymnasium in Pirmasens über, an dem ich im März 1961 das Abitur ablegte. Im gleichen Jahr immatrikulierte ich mich für das Sommer-Semester an der Med. Fakultät der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Dort legte ich im Mai 1962 das Vorphysikum ab. Die folgenden 4 Semester studierte ich an der Universität Erlangen, wo ich im März 1964 das Physikum bestand. Im August 1967 beendete ich nach 6 klinischen Semestern das Studium an der Universität des Saarlandes in Homburg. Vom 1. September 1967 bis 30 Juni 1968 arbeitete ich als Medizinalassistent in der chirurg. Abteilung des Ev. Krankenhauses Zweibrücken und vom 1. Juli 1968 bis zum 30 April 1969 in der I. Med. Univ.-Klinik Homburg. Seit dem 1. Mai 1969 bin ich in der Gynaekologischen Univ.-Klinik in Homburg tätig.

ROTAPRINT-
OFFSET-
DRUCKEREI
Klein
6602 DUDWEILER
Scheidter Straße 26
Tel. Sulzbach 7 32 84
IHR LIEFERANT FÜR DRUCKSACHEN ALLER ART